

PCT
WELTOrganisation FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12M 1/16, 1/14, 1/02	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/57239 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. November 1999 (11.11.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01271		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Internationales Anmeldedatum: 27. April 1999 (27.04.99)		
(30) Prioritätsdaten: 198 20 169.9 30. April 1998 (30.04.98) DE		
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): PRO-PHYTA BIOLOGISCHER PFLANZENSCHUTZ GMBH [DE/DE]; Inselstrasse 12, D-23999 Malchow (DE).		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): LÜTH, Peter [DE/DE]; Fischkaten 48, D-23970 Wismar (DE). EIBEN, Ute [DE/DE]; Inselstrasse 24a, D-23999 Malchow (DE).		
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).		

(54) Title: SOLID-STATE FERMENTER AND METHOD FOR SOLID-STATE FERMENTATION

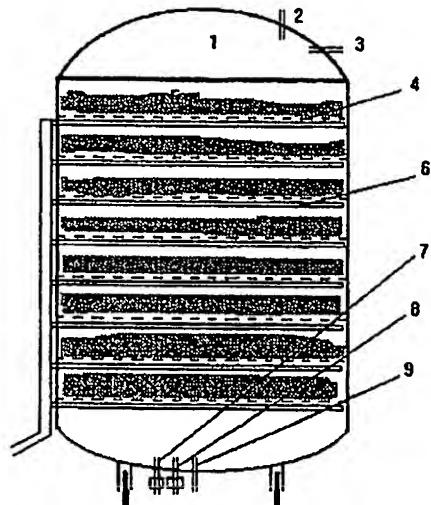
(54) Bezeichnung: SOLID-STATE-FERMENTER UND VERFAHREN ZUR SOLID-STATE-FERMENTATION

(57) Abstract

The invention relates to a solid-state fermenter, especially for large volumes, and to a method for solid-state fermentation. The invention aims at developing a solid-state fermenter for large volumes and at providing a method for solid-state fermentation enabling economic application of solid-state fermentation of low-competing microorganisms in large fermenters. The inventive solid-state fermenter is characterized in that it forms a tier fermenter, wherein at least two air and water permeable tier plates are arranged on top of each other and are attached to the walls of the vat in such a way that no air or water can flow laterally, a culture substrate for the microorganisms to be cultivated is located on the tier plates, a cooling device is mounted beneath each tier plate and the fermenter is closed with a lid.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft einen Solid-State-Fermenter insbesondere für grosse Volumina sowie ein Verfahren zur Solid-State-Fermentation. Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand darin, einen Solid-State-Fermenter für grosse Volumina zu entwickeln und ein Verfahren zur Solid-State-Fermentation bereitzustellen, das eine wirtschaftliche Anwendung der Solid-State-Fermentation von konkurrenzschwachen Mikroorganismen in grossen Fermentern gestattet. Der erfindungsgemäße Solid-State-Fermenter ist dadurch gekennzeichnet, dass er einen Etagenfermenter darstellt, wobei mindestens zwei luft- und wasserdurchlässige Etagenböden übereinander angeordnet sind, die so mit der Wandung des Gefäßes verbunden sind, dass weder Luft noch Wasser seitlich vorbeiströmen kann, sich auf den Etagenböden ein Kultursubstrat für die



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	L1	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Solid-State-Fermenter und Verfahren zur Solid-State-Fermentation

Die Erfindung betrifft einen Solid-State-Fermenter insbesondere für große Volumina sowie ein Verfahren zur Solid-State-Fermentation.

Stand der Technik

Die Submers- oder Solid-State-Fermentation dient zur Massenkultur von Mikroorganismen mit dem Ziel, entweder die Mikroorganismen selbst oder Stoffwechselprodukte oder ein mikrobiell umgewandeltes Substrat (z.B. in der Nahrungsmittelindustrie) zu gewinnen. Während heute schon Submersfermenter (Fermenter mit einem flüssigen Nährsubstrat) mit einem Fassungsvermögen bis zu 200.000 Liter gebaut werden, ist es noch nicht gelungen, Solid-State-Fermenter (Fermenter mit einem festen Nährsubstrat) mit wirtschaftlich relevanten Volumina zu konstruieren, die über eine längere Zeit von Kontaminationen durch fremde Mikroorganismen frei gehalten werden können und gleichzeitig eine optimale Kulturführung der Mikroorganismen ermöglichen. Bestimmte filamentöse Pilze benötigen jedoch Oberflächenstrukturen, an denen sie sich entwickeln und sporulieren können. Der mit 50 Litern Fassungsvermögen größte Fermenter zur Produktion filamentöser Pilze bei Verhinderung jeglicher Fremdkontamination steht im INRA in Frankreich (Durand 1997, mündl. Mitteilung). Die Kapazität dieses Fermenters ist jedoch bei weitem nicht ausreichend, um die Produktion von Pilzsporen, die z.B. als biologisches Pflanzenschutzmittel eingesetzt werden können, wirtschaftlich zu gestalten.

Die Solid-State-Fermentation (SSF) ist definiert als Wachstum von Mikroorganismen - gewöhnlich Pilze - auf festen Substraten in einer definierten Gas-Phase, jedoch ohne eine freie Wasser-Phase. Die SSF wurde in bestimmten Gebieten des Orients, Asiens und Afrikas bereits in der Antike zur Herstellung von fermentierter Nahrung, von Enzymprodukten (Koji) oder von Speisepilzen genutzt. In den westlichen Ländern wurden die

Anstrengungen seit 1940 auf die Submersfermentation konzentriert; die SSF dagegen wurde lediglich für eine Aufarbeitung von organischen Abfällen verwendet. Aufgrund bestimmter Vorteile gegenüber der Submersfermentation zeigen jedoch neuerlich viele Institute und Unternehmen Interesse an der SSF. Solche Vorteile gegenüber der Submersfermentation sind:

- Möglichkeit einer effektiven Produktion von Sekundärmetaboliten wie Enzymen, Aromastoffen, Duft- und Farbstoffen sowie pharmazeutischen Wirkstoffen
- Möglichkeit der Herstellung von Mikroorganismen als biologische Agenzien in Pflanzenschutzmitteln
- Beseitigung von Toxinen oder anderen schädlichen Substanzen aus Nahrungs- und Futtermitteln bzw. Anreicherung von Proteinen oder Vitaminen in denselben.

Man unterscheidet grundsätzlich 6 Typen von Solid-State-Fermentern:

1. Tray Bioreactor
2. Packed Bed Bioreactor
3. Rotary Drum Bioreactor
4. Swing-Solid-State Bioreaktor
5. Stirred Vessel Bioreactor
6. Air-Solid Fluidized-Bed Bioreactor

Der erste Typ - der Tray Bioreactor -, bei dem das zu fermentierende Substrat in eigens dafür vorgesehene Behälter flach ausgebreitet und in einem speziell dafür klimatisierten Raum ('Koji' -Raum, Ramana Murthy, M.V.; Karanth, N.G.; Raghava Rao, K.S.M.S.: Advance in Applied Microbiology 38 (1993), 99-147) inkubiert wird, ist zwar für die Herstellung großer Produktmengen geeignet, bei diesem Verfahren muß aber eine geringe Kontamination durch Fremdkeime vernachlässigt werden können. Zudem sind Reaktor und Verfahren sehr platz- und arbeitsaufwendig. So muß das zu fermentierende Substrat mittels Handarbeit in den Behältern bewegt werden. Für die Herstellung großer Mengen von Pilzsporen konkurrenzschwacher Arten ist er nicht geeignet.

Bei dem 'Packed Bed Bioreaktor' wird ein feuchtes granulöses Substrat, welches sich in einem geschlossenen Behälter befindet, mit einem Mikroorganismus beimpft, der sich, ohne daß das Substrat bewegt wird, in demselben entwickelt. Dazu muß das Substrat ständig von Luft durchströmt werden. Es treten folgende Probleme auf, die die Verwendung großer Substratmengen von vornherein nicht zulassen.

1. Der Mikroorganismus produziert Wärme (300 kJ pro kg Trockenmasse und Std., Saucedo-Castaneda, G.; Gutierrez-Rojas, M.; Bacquet, G.; Raimbault, M.; Viniegra-Gonzalez, G.: Biotechnologie and Bioengineering 35 (1990), 802-808), die entweder durch die Außenwand des Behälters oder durch einen erhöhten Luftstrom (Verdunstungskälte) abgeführt werden kann. Dieses ist bei großen Volumina der Behälter nicht möglich. Die Mikroorganismen verlangsamen bei zunehmender Wärmeentwicklung ihr Wachstum und sterben letztlich ab.
2. Durch eine ständige Durchlüftung trocknet das Substrat aus. Der dadurch bedingte 'Schwund' verursacht Luftkanäle, deren Vorhandensein eine gleichmäßige Durchlüftung des Substrates nicht mehr gewährleistet. Das allmähliche Austrocknen des Substrates führt außerdem zu einem verschlechterten Wachstum des Mikroorganismus.

Der 'Rotary Drum Bioreactor' besteht aus einem zylindrischen Behälter, der horizontal angeordnet und drehbar gelagert ist. Der Behälter ist höchstens bis zu einem Drittel seines Volumens mit einem granulösen Kultursubstrat gefüllt, auf dem der Mikroorganismus wächst. Die durch das Wachstum des Mikroorganismus entstehende Wärme kann weitgehend über den z. T. gekühlten Mantel des Behälters abgeführt werden. Dieses geschieht bei der langsamen Drehung des Zylinders, die dazu führt, daß das Substrat immer wieder mit dem Mantel in Berührung kommt und seine Wärme an diesen abgeben kann. Das Verfahren hat aber den Nachteil, daß innerhalb des sich bewegenden Substrates Scherkräfte wirken, die insbesondere zur Zerstörung sich entwickelnder pilzlicher Strukturen (Myzel, Sporeenträger, Fruchtkörper) führen. Damit ist das Ziel z. B. einer hohen Sporenausbeute bei vielen Pilzen von vornherein

nicht erreichbar. Das Problem der Austrocknung ist bei diesem Fermentertyp weitgehend dadurch gelöst, daß, da die Verdunstung von Wasser aus dem Substrat nicht nötig ist (Verdunstungskälte ist nicht erforderlich), die Belüftung mit feuchter Luft erfolgen kann. Außerdem wäre eine Befeuchtung des Substrates, in dem eine gute Verteilung von freiem Wasser durch die Bewegung gewährleistet ist, auch über Sprühdüsen realisierbar. Bei großen Mengen an Kultursubstrat kommt es bei diesem Fermentertyp allerdings zu weiteren Problemen:

1. Die Konstruktion großer Fermenter ist sehr kostenaufwendig.
2. Durch die kontinuierliche Bewegung des Fermenters kann es zu einer Verklumpung des feuchten Substrates kommen.
3. Es sind Schnittstellen nach außen erforderlich (Luftzu- und Luftabführung, Wasserzuführung), die durch die Rotation des Fermenters leicht zu Quellen einer Fremdkontamination werden können.

Ein ähnlicher Fermenter wie der 'Rotary Drum Bioreactor' ist der 'Swing-Solid-State Bioreactor', nur daß hier die Mischung des Substrates nicht durch eine rotierende Bewegung sondern durch eine schüttelnde Bewegung verursacht wird. Ansonsten gelten die gleichen, bereits genannten Vor- und Nachteile. Eine Volumenbegrenzung dieses Fermentertyps ist jedoch zusätzlich noch dadurch gegeben, daß die Konstruktion des komplizierten Schüttelmechanismus eine Masse des gefüllten Behälters über 100 kg kaum zulassen dürfte.

Den 'Stirred Vessel Bioreaktor' kann man sich als einen geschlossenen Kessel vorstellen, in dem ein Rührwerk läuft. Bei diesem Reaktortyp sind die Probleme bei Verwendung großer Substratmengen vorgezeichnet, da diese nicht mehr gleichmäßig bewegt werden können, ohne daß es zu Zerstörungen in der Substratstruktur kommen würde.

Im 'Air-Solid Fluidized-Bed Bioreactor' wird das Kultursubstrat für die Mikroorganismen ständig in einem Wirbelbett gehalten, wozu ein verhältnismäßig großes Volumen des Reaktorraumes erforderlich ist. Die zur Aufrechterhaltung des Wirbelbettes erforderliche Luft wird im Kreislauf geführt. In der Luft muß

ein genau bestimmter Feuchtegehalt aufrechterhalten werden. Das Verfahren erfordert sehr viel Energie zur Aufrechterhaltung des Wirbelbettes. In einem bereits gelaufenen AiF-Projekt (Bahr, d.; Menner, M.: BIOforum 18 (1995), 16 - 21) konnte zwar gezeigt werden, daß die Kultur von Hefezellen in der Wirbelschicht möglich ist.

Dieses wurde jedoch nur in einem relativ kleinen Maßstab und bei im Vergleich zur Submersfermentation relativ kleinen Ausbeuten erreicht. Eine mehrwöchige Kultur filamentöser Pilze an großen Mengen granulösem Kultursubstrat (über 100 kg pro Batch) ist mit dieser Technologie nur mit indiskutabel hohen Kosten möglich.

Weitere Fermenter des Standes der Technik sind zu klein, um mit Ihnen eine wirtschaftlich rentable Menge an Pilzsporen zu gewinnen (EP-A1-0 683 815 und FR 85.08555) oder es ist bei ausreichender Fermenterkapazität nicht möglich, eine Kontamination des Kultursubstrates mit Fremdkeimen über einen längeren Zeitraum auszuschließen (DE 4406632 C1).

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, einen SSF-Fermenter für große Volumina zu entwickeln und ein Verfahren zur Solid-State-Fermentation bereitzustellen, das eine wirtschaftliche Anwendung der SSF von konkurrenzschwachen Mikroorganismen in großen Fermentern gestattet.

Dabei soll

1. eine Fremdkontamination des Fermenters verhindert werden (Aufrechterhaltung steriler Bedingungen während des gesamten Fermentationsprozesses),
2. die durch den pilzlichen Stoffwechsel entstehende Wärme abgeführt werden, ohne daß es zu einer Austrocknung des Substrates (durch erhöhten Luftdurchsatz und Nutzung der Verdunstungskälte) kommt,
3. das Auftreten von Scherkräften im Fermenter verhindert werden (keine Bewegung des Kultursubstrates) und
4. eine gleichmäßige Belüftung (bei Verhinderung der Austrocknung) und Temperaturführung des Substrates gegeben

sein.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert. Die Aufgabe wurde erfindungsgemäß durch einen Etagenfermenter gelöst, der ein Fassungsvermögen von mindestens 50 Litern, vorzugsweise 500 Litern bis 1000 Litern aufweist, aber auch größere Fassungsvermögen ermöglicht. Die Gesamtkonstruktion besteht aus einem zylindrischen oder ovalen Gefäß (Abbildung 1), das oben durch einen Deckel 1, der gegebenenfalls mit einer Luftableitung 2 sowie einer Öffnung 3 zur Beimpfung des Fermenters versehen ist, verschlossen werden kann.

In dem Gefäß, das als luft- und wasserundurchlässige Hülle konstruiert ist, befinden sich übereinander angeordnete luft- und wasserdurchlässige Etagenböden 4, die zur Aufnahme eines Kultursubstrates 5 für die zu kultivierenden Mikroorganismen dienen.

Das Kultursubstrat besteht entsprechend dem jeweiligen Nährstoffanspruch des zu kultivierenden Mikroorganismus aus unterschiedlichen Materialien. Um eine ausreichende Luftpumpe zu gewährleisten, weist dieses Material bevorzugt eine granulöse Struktur auf. Es kann z. B. aus Getreide, Pellets aus Kleie oder sonstigen organischen Abfallprodukten, Abfällen aus der Zuckerproduktion oder mit Nährösung getränkten Granulaten bestehen.

Die Anzahl der Etagen ist von den Kultursprüchen des zu kultivierenden Mikroorganismus sowie von der Handhabbarkeit des gesamten Fermenters abhängig. Bei zu vielen Etagen könnte die für das Wachstum der Mikroorganismen erforderliche Sauerstoffversorgung (s.u.) in den oberen Kultursubstratschichten gestört sein. Auch verschlechtern sehr viele Etagen die Handhabbarkeit des Fermenters. Erfindungsgemäß können jedoch 20 oder mehr Etagen im Fermenter untergebracht werden.

Die Etagenböden sind derart mit der Wandung des Gefäßes

verbunden, daß weder Luft noch Wasser seitlich an ihnen vorbeiströmen kann. Der Abstand der Etagenböden voneinander ist abhängig von der optimalen Schichtdicke des Kultursubstrates, die wiederum von den Ansprüchen des zu kultivierenden Mikroorganismus bestimmt wird.

Unter den Etagenböden befinden sich Kühleinrichtungen 6, die als Kühlslangen oder Kühlplatten konstruiert sein können. Mit ihrer Hilfe wird die Reaktionswärme aus dem Kultursubstrat abgeführt. In einer bevorzugten Variante können von jeder Kühleinrichtung ausgehend, Bleche aus Metall mit einer hohen Wärmeleitfähigkeit durch den jeweiligen Etagenboden hindurch in das Kultursubstrat hineinragen (Abbildung 2). Damit wird die Abführung der Reaktionswärme erleichtert. Zur Entnahme des Kultursubstrates nach Beendigung des Fermentationsprozesses vom Etagenboden wird die Kühleinrichtung mit samt den Kühlblechen vom Etagenboden nach unten abgezogen. Danach kann das mit den Mikroorganismen bewachsene Kultursubstrat entnommen werden, ohne das die Kühlbleche dabei stören.

Die Kühleinrichtungen können auch in einem bestimmten Abstand über den Etagenböden angebracht werden. In diesem Falle sollten sie so installiert werden, daß sie in der Mitte der Kultursubstratschicht verlaufen. Die Anlage der Kühleinrichtungen in den Substratschichten (parallel zu den Etagenböden) ist insbesondere für den Fall vorzusehen, daß im Prozeß der Fermentation sehr viel Reaktionswärme gebildet wird.

Im Boden des Fermenters befindet sich eine Luftzufuhr 7, durch die sterile, angefeuchtete Luft in den Fermenter eingeblasen wird. Die Luft durchströmt alle Substratschichten und verläßt den Fermenter durch den am Deckel angebrachten Luftabfluß 2.

Die sich zwischen den Etagen befindlichen Zwischenräume, in denen auch die Kühleinrichtungen untergebracht sind, gewährleisten eine gleichmäßige Verteilung der Luft im gesamten Fermenter. Steht zur Belüftung des Fermenters keine angefeuchtete Luft zur Verfügung, so kann die Luft auch

innerhalb des Fermenters angefeuchtet werden. Dies geschieht, indem wenigstens der unterste Etagenboden nicht mit einem Kultursubstrat sondern mit einem wasseraufnahmefähigen granulösen Material gefüllt ist, das zunächst von der zugeführten Luft durchströmt wird, bevor diese weiter in den Fermenter vordringt. Dadurch wird sie angefeuchtet. Bei einem starken Wasserbedarf des sich entwickelnden Mikroorganismus können mehrere solcher Etagen zur Befeuchtung der Luft in Abständen im Fermenter installiert sein. Die Menge der einzuführenden Luft ist abhängig vom Sauerstoffbedarf des zu kultivierenden Mikroorganismus. Sie kann zwischen 1 und 100 Liter pro Stunde pro Liter Kultursubstrat variieren.

Zur Beimpfung des Kultursubstrates mit dem zu kultivierenden Mikroorganismus wird der Fermenter, nachdem sein Inhalt zuvor sterilisiert wurde, mit sterilem Wasser bis über die oberste Kultursubstratschicht angestaut. Dazu ist am Fermenterboden ein Wasserzufluß 8, dem ein Sterilfilter vorgeschaltet ist, angebracht. Der Wasserzufluß kann jedoch auch an anderer Stelle des Fermenters (z.B. am Deckel) installiert sein. Nach dem Anstauen wird durch eine dafür vorgesehene Öffnung 3 im Deckel das Inokulum eingebracht. Derartige Öffnungen 3 zur Beimpfung des Fermenters können insbesondere bei sehr vielen Etagen auch zwischen den einzelnen Etagenböden angebracht sein. Im ersten Falle erfolgt die Verteilung des Inokulums im Fermenter ausschließlich beim Wiederablassen des Wassers durch eine dafür vorgesehene Öffnung 9 im Boden des Fermenters.

Das Inokulum (Suspension von Mikroorganismen) durchfließt auf diese Art und Weise alle Kultursubstratschichten und bleibt in ausreichender Menge mit dem anhaftenden Wasser in denselben zurück. Bei zu vielen zu durchströmenden Schichten tritt ggf. abhängig von der Beschaffenheit des Kultursubstrates ein Verdünnungseffekt auf. Das heißt die Mikroorganismen werden durch das zu durchströmende Kultursubstrat abgefiltert, so daß ihre Konzentration im Wasser nach unten hin immer geringer wird. Um dies zu verhindern, können in einer weiteren Variante auch zwischen den Etagenböden Öffnungen zum Einbringen des

Inokulums in den Fermenter angebracht sein. Mit ihrer Hilfe kann bereits während des Anstauens des Fermenters mit Wasser Inokulum eingebracht werden, welches dann sowohl mit dem aufwärts als auch mit dem abwärts gerichteten Wasserstrom verteilt wird.

Das für die Beimpfung des Fermenters zu verwendende Inokulum besteht aus einer hochkonzentrierten Suspension kleiner keimungsfähiger Einheiten (vorzugsweise aus Sporen, Konidien oder bakteriellen Keimen) des zu kultivierenden Mikroorganismus.

Unter Voraussetzung einer gleichmäßigen und ausreichenden Beimpfung des Fermentergefäßes ist der Kulturverlauf (Kulturdauer und Produktausbeute) sowie die Qualität des Kulturproduktes (z.B. Pilzsporen) weitgehend von den Parametern der Kulturführung abhängig. Diese besteht in erster Linie in der Zufuhr angefeuchteter Luft und der Temperaturführung. Der Luftvolumenstrom ist mit der Kapazität des Luftsterilfilters abzustimmen. Die Temperaturführung im Fermenter wird mit Hilfe der im Fermenter installierten Kühlung abgesichert. Die Kühlkapazität muß so ausgelegt sein, daß sämtliche Reaktionswärme aus dem Kultursubstrat abgeführt und eine optimale Temperatur für die Kultur des Mikroorganismus aufrecht erhalten werden kann. Die erforderliche Kühlkapazität ist auch von der Schichtdicke und damit vom Volumen des Kultursubstrates abhängig. Je mehr Kultursubstrat für das Wachstum der Mikroorganismen zur Verfügung steht, desto mehr Reaktionswärme wird erzeugt. Daher müssen beide Parameter gemeinsam optimiert werden. Angestrebt wird eine möglichst schnelle Entwicklung der Mikroorganismen sowie eine hohe Produktausbeute, wobei als Produkt je nach Zielstellung der Fermentation, Pilzsporen, Bakterienzellen, Enzyme, Antibiotika, Farbstoffe und weitere Stoffe in Frage kommen.

Es werden zwei Ausführungsvarianten des erfindungsgemäßen Fermenters bereitgestellt.

Variante 1. (Abbildung 3)

Der Fermenter besteht aus einem durchgängigen Zylinder oder einem Prisma, die unten fest verschlossen sind. Der Zylinder (in der Regel ein Kreiszylinder) oder das Prisma können einen Durchmesser von 1 m und mehr haben. Seine Höhe ist durch die technische Handhabbarkeit sowie die Möglichkeit der Aufrechterhaltung optimaler Bedingungen für den zu kultivierenden Mikroorganismus begrenzt. Es sind Höhen von 2 m und mehr realisierbar.

In diesen Zylinder oder das Prisma werden die Etagenböden 4, befüllt mit Kultursubstrat 5, von oben eingebracht. An der Innenseite des Behälters befinden sich Ringe oder, im Falle, daß ein prismatisches Gehäuse verwendet wird, anders geformte Vorrichtungen 11 zur Auflage der Etagenböden. Jeder Ring oder anders geformte Auflagevorrichtung ist mit einer hitzstabilen Dichtung 10, z.B. aus Silikon, versehen, auf die die Etagenböden mit ihrer äußeren Kante aufgelegt werden, wodurch ein luft- und wasserdichter Abschluß zwischen Etagenboden und Gefäßwandung gegeben ist. Die Ringe oder anders geformten Auflagevorrichtungen können aus dem Gehäuse entnommen werden. Die Kühlleinrichtung 6 unter dem Etagenboden, die z.B. aus einer Kühlslange aus Kupferrohr bestehen kann, wird mittels einer Schnellkupplung 13 mit den Leitungen 14 zum Ab- und Zufluß der Kühlflüssigkeit, die sich außerhalb des Fermenters befinden, verbunden. Jeder Etagenboden ist mit einem Rand 12 versehen, dessen Höhe sich nach der Schichtdicke des Kultursubstrates richtet. Dadurch wird verhindert, daß das Kultursubstrat in das Fermentergefäß fällt und diesen verunreinigt.

Der Fermenter wird oben mit dem Deckel 1 fest verschlossen. Er ist als Druckgefäß ausgelegt und kann somit durch die Einleitung von heißem unter Druck stehenden Dampf sterilisiert werden. Es ist daher nicht erforderlich, einen Autoklaven zu nutzen.

Variante 2. (Abbildung 4)

Der Fermenter besteht aus mehreren Zylindern oder Prismen mit jeweils einer geringen Höhe (vorzugsweise ca. 7 - 30 cm), die eine kreisförmige, ovale, recht- oder anderseckige Grundfläche haben können. In die einzelnen Zylinder oder Prismen ist jeweils ein luft- und wasserdurchlässiger Boden eingezogen. Unter dem Boden befindet sich die Kühlvorrichtung und auf dem Boden liegt das Substrat zur Kultur der Mikroorganismen. Die Zylinder oder Prismen dienen als Etagen 4 des zusammengesetzten Fermenters. Sie werden übereinander angeordnet und durch hitzestabile Dichtungen 15, die auf den Rändern liegen, gegeneinander abgedichtet. Die erste Etage liegt unten auf dem Fermenterboden auf, und die letzte Etage wird oben von dem Fermenterdeckel verschlossen. Der Fermenter kann so vorzugsweise aus 10 oder mehr Etagen zusammengesetzt werden. Da es schwierig ist, einen solchen zusammengesetzten Fermenter als Druckgefäß zu bauen, erfolgt die Sterilisation des Fermenters und des sich in ihm befindlichen Kulturstoffes in einem Autoklaven. Die Größe des Fermenters ist somit in erster Linie vom Fassungsvermögen des zur Verfügung stehenden Autoklaven abhängig. Er wird daher in den meisten Fällen auf ein Volumen von 500 - 1000 Litern beschränkt bleiben müssen. Während des Autoklavierens ist der Fermenter noch geöffnet, das heißt, die einzelnen Etagen sind leicht (ca. 5 mm) voneinander abgehoben. Dadurch wird eine gute Zufuhr des die Sterilisation bewirkenden heißen Dampfes in den Fermenterinnenraum ermöglicht. Nach dem Autoklavieren wird der Fermenter fest verschlossen. Um eine Kontamination des Fermenters mit Fremdkeimen nach dem Autoklavieren und vor dem Verschließen, also während der Entnahme des Fermenters aus dem Autoklaven, zu verhindern, ist jede Etage mit einem Außenring 16 versehen, der die Aufgabe hat, den zwischen den Etagen im geöffneten Zustand vorhandenen Spalt zu überlappen.

Nach dem Schließen des Fermenters werden die sich unter den Etagenböden befindlichen Kühlseinrichtungen 6 mittels einer

Kupplung 17 mit den Leitungen 14, welche zum Zu- und Abfluß der Kühlflüssigkeit dienen, verbunden.

In einer bevorzugten Ausführungsvariante besteht ein granulöses Kultursubstrat, an dem sich die Mikroorganismen entwickeln sollen, aus einer 5 - 6 cm dicken Schicht. Es werden bis zu 10 solcher Schichten übereinander angeordnet. Das in Schichten angeordnete granulöse Kultursubstrat lagert jeweils auf einem durchbrochenen und damit luftdurchlässigen Boden, unter dem sich eine Kühlslange (gewundenes Kupferrohr) befindet, mit deren Hilfe die im Substrat entstehende Wärme abgeführt werden kann. Die Zufuhr von steril gefilterter Luft erfolgt von unten. Durch den hermetischen Abschluß der Etagen zur Seite hin, ist die Luft gezwungen, alle Etagen (Kultursubstratschichten) gleichmäßig zu durchströmen, bevor sie oben den Fermenter wieder verläßt. Auf dem untersten Etagenboden befindet sich eine wassergesättigte Schicht, vorzugsweise SERAMIS-Granulat, durch die die Luft hindurchgeleitet wird, wodurch sie angefeuchtet wird.

Die Sterilisation des Fermenters mit samt des bereits eingebrachten Kultursubstrates erfolgt vorzugsweise durch auf 121 °C erhitzten Dampf, vorzugsweise im Autoklaven, wobei die einzelnen Etagen während des Autoklavievorganges leicht voneinander abgehoben sind, so daß der heiße Dampf in die Etagen eindringen kann.

Weitere Daten: Volumen:	500 Liter
Menge Kultursubstrat:	250 Liter
Luftvolumenstrom:	1500 Liter pro Stunde
Leistung des Kühlsystems:	2,5 kW

Im Unterschied zu bisher genutzten Typen (Swing-Solid-State-Fermenter oder rotierende Fermenter), wo zur Wärmeabfuhr, Belüftung und Wasserversorgung eine ständige Umschichtung des Kultursubstrates vorgenommen werden muß, ist es bei Anwendung des erfundungsgemäßen Verfahrens nicht mehr erforderlich, das Substrat zu bewegen. Die Lagerung des Kultursubstrates in

etagierten Schichten, welche insgesamt von einer geschlossenen Hülle ummantelt sind, bietet folgende Vorteile:

1. Das Eigengewicht des Kultursubstrates führt nicht zur Verdichtung und damit zur Herabsetzung der Luftdurchlässigkeit desselben.
2. Durch die Installation einer Kühlvorrichtung unter den einzelnen Etagen kann entstehende Wärme leicht abgeführt werden.
3. Durch eine relativ geringe Etagenstärke sowie die zwischen den Etagen vorhandenen Räume ist eine gleichmäßige Durchlüftung der Substratschichten gewährleistet.
4. Da die Durchlüftung des Substrates lediglich der Sauerstoffzufuhr sowie der Abfuhr entstehender Gase und nicht der Kühlung des Substrates dient, kann mit einem sehr geringen Luftvolumenstrom gearbeitet werden, der, da die Luft zudem angefeuchtet wird, nicht mehr zum Austrocknen des Substrates führt.
5. Da die Bewegung des Substrates nicht mehr erforderlich ist, kann eine mechanische Zerstörung von Pilzstrukturen (Sporeenträger, Fruchtkörper etc.) ausgeschlossen werden.

Ausführungsbeispiele

Abbildung 1: Prinzipzeichnung des Fermenters
Abbildung 2: Kühleinrichtung des Fermenters mit Wärmeleitblechen
Abbildung 3: Ausschnitt eines Fermenters, bestehend aus einem durchgängigen Zylinder
Abbildung 4: Ausschnitt eines zusammengesetzten Fermenters

Beispiel 1

Massenkultur von Beauveria brongniartii zum Zwecke der Gewinnung von Pilzkonidien

Der zur Kultur von Beauveria brongniartii verwendete Fermenter hat ein Fassungsvermögen von ca. 50 Litern. Er weist die Form

eines Zylinders mit einem Durchmesser von 30 cm und einer Höhe von 70 cm auf. Die Außenhülle des Fermenters besteht aus hitzestabilem Glas. In den Fermenter wurden 8 Etagen eingebaut, deren Böden aus einem Edelstahlsieb mit einer Maschenweite von 3 mm bestehen. Der Abstand der Etagenböden voneinander betrug 8 cm. Der untere Boden wurde mit einer 6 cm starken Schicht SERAMIS-Granulat gefüllt. Die darüber liegenden 7 Etagen enthielten gequetschte Gerstenkörner als Kultursubstrat. Die Schichtdicke des Kultursubstrates betrug ca. 6 cm. Insgesamt wurden 30 Liter Kultursubstrat verwendet.

Der Fermenter wurde mit Hilfe eines Autoklaven sterilisiert. Dazu wurde der Fermenterinhalt mit Hilfe von heißem Dampf für die Dauer einer halben Stunde auf 121 °C erhitzt. Der Deckel des Fermenters war während des Autoklaviervorganges leicht geöffnet, um das Eindringen des Dampfes in den Fermenterinnenraum zu ermöglichen. Er wurde sofort nach dem Autoklavieren geschlossen.

Zur Beimpfung wurde der Fermenter bis über die oberste Kultursubstratschicht mit sterilem Wasser gefüllt. Hierzu wurde ein 500 cm² Capsule des Typs S+S-EXELON PES 20/5 HC (Schleicher und Schuell, Dassel) verwendet. Im Anschluß daran wurde durch eine dafür vorgesehene Öffnung im Deckel das Inokulum eingebracht. Die Beimpfung des Fermenters erfolgte unter einer Laminar-Box. Als Inokulum wurden 100 ml einer Konidiensuspension mit 1×10^9 Konidien pro ml verwendet. Nach der Einbringung des Inokulums über die Oberste Kultursubstratschicht wurde das Wasser durch ein Ventil am Fermenterboden abgelassen. Dadurch wurden alle Substratschichten gleichmäßig mit den Pilzkonidien kontaminiert.

Nach der Beimpfung des Fermenters wurde dieser in einem Raum mit einer Temperatur von 20 °C inkubiert. Es erfolgte ein Anschluß an die Luftzufuhr sowie an das Kühlssystem. Der Luftvolumenstrom betrug während des gesamten Fermentationsvorganges 150 Liter pro Stunde. Als

Kühlflüssigkeit wurde Wasser mit einer Vorlauftemperatur von 17 °C verwendet. Die Steuerung der Kühlung war so eingestellt, daß bei einem Überschreiten von 22 °C im Kultursubstrat die Kühlflüssigkeit durch die Kühlslange gepumpt wurde, bis wieder 20 °C erreicht waren. Auf diese Art und Weise konnte eine durchschnittliche Substrattemperatur von ca. 21 °C während der gesamten Kulturdauer aufrecht erhalten werden.

Ziel der Kultur war eine möglichst hohe Ausbeute an Pilzkonidien. Durch den Glasmantel des Fermenters konnte der Kulturverlauf sehr gut beobachtet werden. Nach etwa 10 Tagen war das gesamte Kultursubstrat von einem weißen Myzel überzogen. Durch die Bildung von Konidien und Konidienträgern veränderte dieses Myzel ab dem 13 Tage sein Erscheinungsbild. Es bekam eine pulverförmige Struktur. Nach etwa 19 Tagen verlor der Fermenter deutlich an Stoffwechselaktivität. Die Wärmeentwicklung verringerte sich, wodurch die Kühlfrequenz deutlich herabgesetzt wurde. Das Kultursubstrat wurde 21 Tage nach der Beimpfung des Fermenters entnommen und die Konidien mittels spezieller Filtrationstechnik aus dem nunmehr vollständig mit *Beauveria brogniartii* bewachsenen Kultursubstrat gewonnen.

Insgesamt konnten $3,3 \times 10^{13}$ Konidien mit Hilfe des Etagenfermenters gewonnen werden.

Bezugszeichenliste

- 1 Deckel
- 2 Luftabfluß
- 3 Fermenter
- 4 luftdurchlässiger Etagenboden
- 5 Kultursubstrat
- 6 Kühleinrichtung
- 7 Luftzuführung
- 8 Wasserzuführung
- 9 Wasserabführung
- 10 hitzestabile Dichtung
- 11 Auflagevorrichtung für Etagenboden
- 12 Rand des Etagenbodens
- 13 Schnellkupplung
- 14 Kühlflüssigkeitsab- und -zuflußleitung
- 15 hitzestabile Dichtung
- 16 Außenring
- 17 Kupplung

Patentansprüche**1. Solid-State-Fermenter**

dadurch gekennzeichnet, daß

er einen Etagenfermenter darstellt, wobei

mindestens zwei luft- und wasserdurchlässige Etagenböden (4) übereinander angeordnet sind, die so mit der Wandung des Gefäßes verbunden sind, daß weder Luft noch Wasser seitlich vorbeiströmen kann,

sich auf den Etagenböden (4) ein Kultursubstrat (5) für die zu kultivierenden Mikroorganismen befindet,

unter jedem Etagenboden (4) eine Kühlleinrichtung (6) angebracht ist und

der Fermenter mit einem Deckel (1) verschlossen ist.

2. Fermenter nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß er

einen durchgängigen zylindrischen, ovalen, recht- oder anderseckigen Behälter mit mindestens einer Öffnung (3) für das Inokulum darstellt.

3. Fermenter nach Anspruch 1 oder 2,

dadurch gekennzeichnet, daß

von der Kühlleinrichtung Bleche aus Metall mit einer hohen Wärmeleitfähigkeit durch den jeweiligen Etagenboden hindurch in das Kultursubstrat hineinragen.

4. Fermenter nach einem der Ansprüche 1 bis 3,

dadurch gekennzeichnet, daß sich

am Behälter eine Wasserzufuhr (8),

im Boden des Fermenters eine Luftzufuhr (7) sowie ein Abfluß (9) für das Wasser befindet und

am Deckel (1) eine Öffnung zum Luftabfluß (2) vorhanden ist, die Etagenböden (4), befüllt mit Kultursubstrat (5), nacheinander eingebracht wurden, wozu in der Innenseite des Behälters Ringe oder anders geformte Vorrichtungen (11) zur Auflage der Etagenböden (4) angebracht sind, die mit einer hitzesfesten Dichtung (10) versehen sind und die Etagenböden

einen Rand (12) aufweisen, dessen Höhe von der Schichtdicke des Kultursubstrates abhängig ist sowie die Kühlleinrichtungen (6) über eine Schnellkupplung (13) mit Leitungen (14) für Ab- und Zufluß der Kühlflüssigkeit, die sich außerhalb des Fermenters befinden, verbunden sind.

5. Fermenter nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet, daß
sich der Wasserzufluß (8) im Boden oder Deckel des Fermenters befindet.

6. Fermenter nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet, daß
sich eine Öffnung für das Inokulum im Deckel befindet und ggf. weitere Öffnungen zur Beimpfung zwischen den einzelnen Etagenböden angeordnet sind.

7. Fermenter nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, daß
der Fermenter mehrere zylindrische, ovale oder prismatische Behälter enthält, die als Etagen dienen, und die übereinander angeordnet sind, so daß der erste Behälter unten auf dem Fermenterboden aufliegt und der letzte mit dem Deckel (1) verschlossen ist, und die Behälter durch hitzestabile Dichtungen (15) gegeneinander abgedichtet und mit einem Außenring (16) versehen sind,
jeder dieser Behälter einen luft- und wasserdurchlässigen Boden (4) aufweist, auf dem sich das Kultursubstrat (5) und unter dem sich die Kühlvorrichtung (6) befindet, die mittels einer Kupplung (17) mit Ab- und Zuflußleitungen (14) für die Kühlflüssigkeit, die sich außerhalb des Fermenters befinden, verbunden sind.

8. Fermenter nach einem der Anprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet, daß
das Kultursubstrat poröse Granulate, die mit einer Nährlösung versehen werden oder natürliche granulöse Materialien sind.

9. Fermenter nach Anpruch 8,
dadurch gekennzeichnet, daß
natürliche granulöse Materialien Getreide, Pellets aus Kleie
oder Abfälle aus der Zuckerproduktion sind.

10. Fermenter nach einem der Anprüche 1 bis 9,
dadurch gekennzeichnet, daß
sich mindestens auf dem untersten Etagenboden eine
Befeuchtungsschicht befindet.

11. Fermenter nach Anpruch 10,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Befeuchtungsschicht ein wasseraufnahmefähiges, granulöses
Material mit einem extrem hohen Porenvolumen ist.

12. Verfahren zur Solid-State-Fermentation mit einer
Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet, daß
ein Kultursubstrat, das sich auf mehreren Etagenböden im
Fermenter befindet, gleichmäßig beimpft, vollständig von einem
relativ geringen Luftvolumenstrom durchströmt und mittels
Kühlsystem die optimale Temperatur für den jeweiligen
Kulturvorgang eingestellt wird.

13. Verfahren nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Beimpfung mit dem zu vermehrenden Mikroorganismus durch
Anstauen des Fermenters mit Wasser, dem die Keime in
ausreichender Menge beigegeben werden, in einer Weise erfolgt,
daß alle Schichten sowohl beim Anstauen als auch beim Abfließen
gleichmäßig durchströmt und beimpft werden.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Kühlkapazität in Abhängigkeit des Volumens des
Kultursubstrates so bemessen wird, daß sämtliche Reaktionswärme
aus dem Kultursubstrat abgeführt wird.

1 / 4

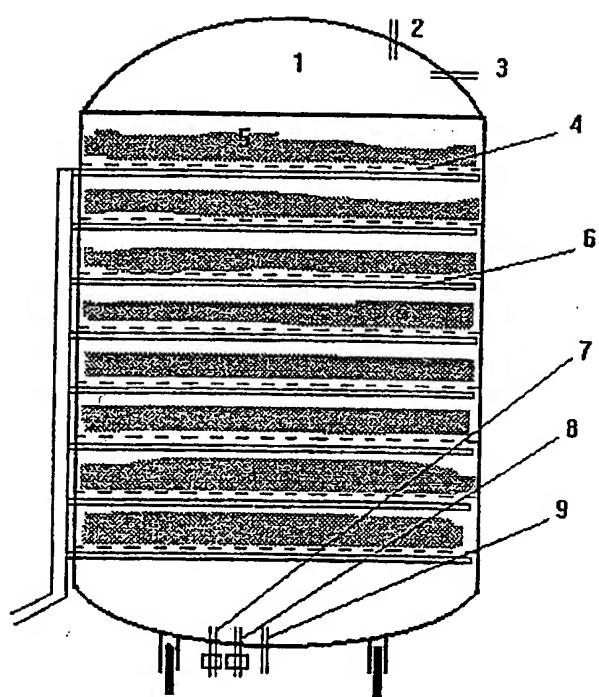


Abbildung 1

2 / 4

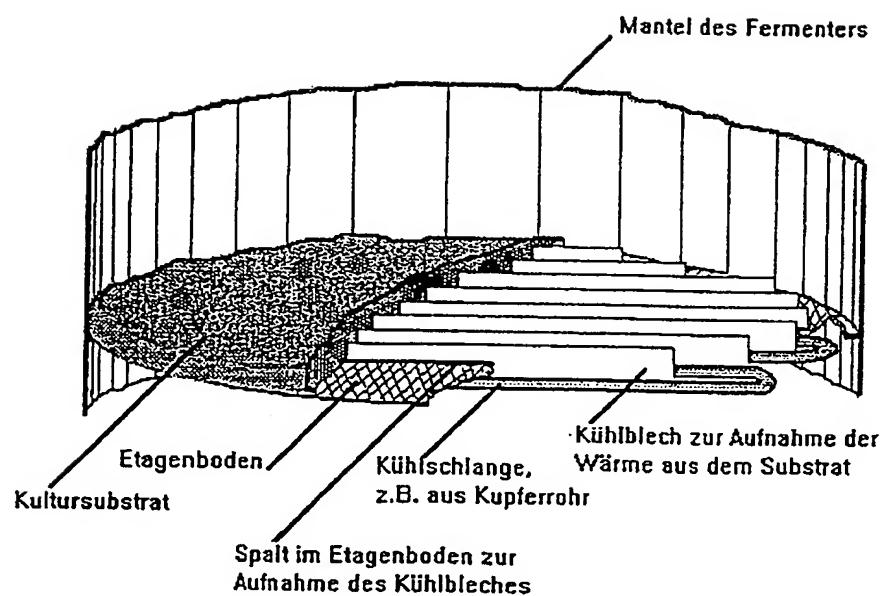


Abbildung 2

3 / 4

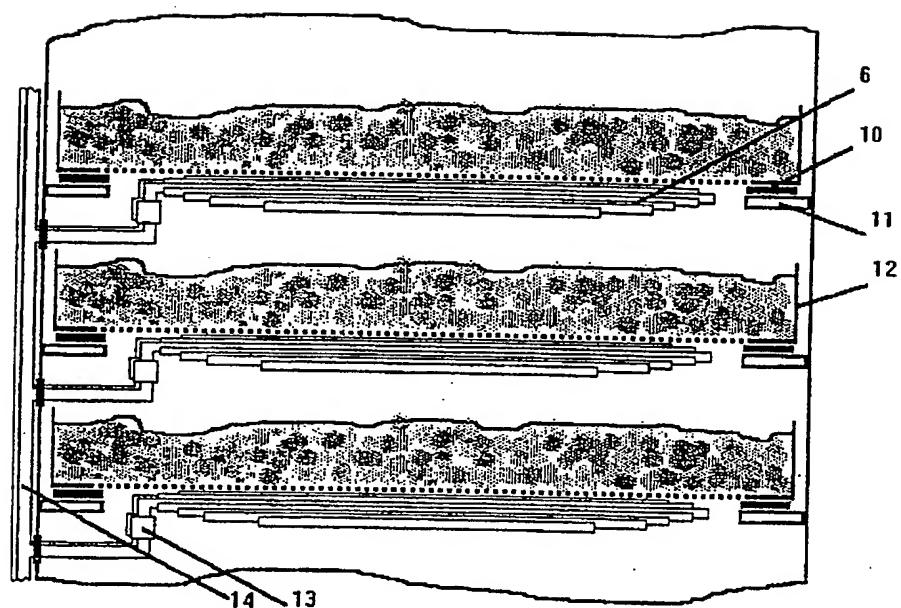


Abbildung 3

4 / 4

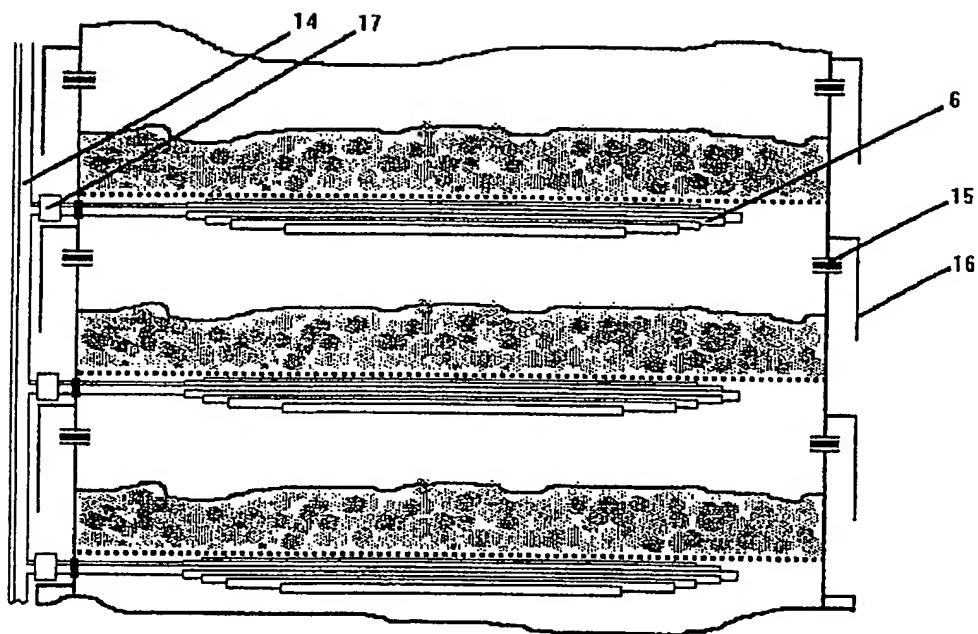


Abbildung 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 99/01271

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12M1/16 C12M1/14 C12M1/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12M		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GB 1 156 739 A (AFICO S.A.) 2 July 1969 (1969-07-02) claims 1-20; figures 1,2	1,2
A	US 3 753 582 A (GRAHAM C) 21 August 1973 (1973-08-21) claims; figure 1	1
Y	FR 1 474 370 A (FALSTAFF BREWING CORPORATION) 8 June 1967 (1967-06-08) claims; figures 1,2	1,2
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
22 October 1999	04/11/1999	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Coucke, A	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. nal Application No
PCT/DE 99/01271

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SU 170 901 A (PIGULEVSKY N. A. ET AL.) 27 July 1964 (1964-07-27) figure & DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; Class 6C, AN 913790 abstract -----	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

Interr. Application No.
PCT/DE 99/01271

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
GB 1156739	A	02-07-1969	AU	416676 B	22-05-1969
			BE	706709 A	17-05-1968
			CH	469806 A	
			DE	1642579 A	05-01-1972
			ES	347837 A	01-06-1969
			FR	1553012 A	10-01-1969
			NL	6715923 A	04-06-1968
			US	3575813 A	20-04-1971
US 3753582	A	21-08-1973	NONE		
FR 1474370	A	08-06-1967	BE	678981 A	04-10-1966
			DE	1542140 A	26-03-1970
			DK	116652 B	02-02-1970
			GB	1134718 A	
			NL	6604530 A	06-10-1966
SU 170901	A		NONE		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/01271

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12M1/16 C12M1/14 C12M1/02													
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK													
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12M													
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen													
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)													
C. ALS WESENTLICH ANGEGEHENE UNTERLAGEN													
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Kategorie*</th> <th>Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile</th> <th>Beir. Anspruch Nr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>GB 1 156 739 A (AFICO S.A.) 2. Juli 1969 (1969-07-02) Ansprüche I-20; Abbildungen 1,2 ---</td> <td>1,2</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 3 753 582 A (GRAHAM C) 21. August 1973 (1973-08-21) Ansprüche; Abbildung 1 ---</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>FR 1 474 370 A (FALSTAFF BREWING CORPORATION) 8. Juni 1967 (1967-06-08) Ansprüche; Abbildungen 1,2 ---</td> <td>1,2 -/-</td> </tr> </tbody> </table>		Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beir. Anspruch Nr.	Y	GB 1 156 739 A (AFICO S.A.) 2. Juli 1969 (1969-07-02) Ansprüche I-20; Abbildungen 1,2 ---	1,2	A	US 3 753 582 A (GRAHAM C) 21. August 1973 (1973-08-21) Ansprüche; Abbildung 1 ---	1	Y	FR 1 474 370 A (FALSTAFF BREWING CORPORATION) 8. Juni 1967 (1967-06-08) Ansprüche; Abbildungen 1,2 ---	1,2 -/-
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beir. Anspruch Nr.											
Y	GB 1 156 739 A (AFICO S.A.) 2. Juli 1969 (1969-07-02) Ansprüche I-20; Abbildungen 1,2 ---	1,2											
A	US 3 753 582 A (GRAHAM C) 21. August 1973 (1973-08-21) Ansprüche; Abbildung 1 ---	1											
Y	FR 1 474 370 A (FALSTAFF BREWING CORPORATION) 8. Juni 1967 (1967-06-08) Ansprüche; Abbildungen 1,2 ---	1,2 -/-											
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen													
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie													
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen: "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonderer bedeutsam anzusehen ist "E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweideutig erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist													
T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erländischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erländischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist													
Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts												
22. Oktober 1999	04/11/1999												
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentzaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Coucke, A												

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHTInternationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/01271

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	SU 170 901 A (PIGULEVSKY N. A. ET AL.) 27. Juli 1964 (1964-07-27) Abbildung & DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; Class 6C, AN 913790 Zusammenfassung -----	1,2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern	tales Aktenzeichen
PCT/DE 99/01271	

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
GB 1156739 A	02-07-1969	AU	416676 B	22-05-1969
		BE	706709 A	17-05-1968
		CH	469806 A	
		DE	1642579 A	05-01-1972
		ES	347837 A	01-06-1969
		FR	1553012 A	10-01-1969
		NL	6715923 A	04-06-1968
		US	3575813 A	20-04-1971
US 3753582 A	21-08-1973	KEINE		
FR 1474370 A	08-06-1967	BE	678981 A	04-10-1966
		DE	1542140 A	26-03-1970
		DK	116652 B	02-02-1970
		GB	1134718 A	
		NL	6604530 A	06-10-1966
SU 170901 A		KEINE		

THIS PAGE LEFT BLANK

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE LEFT BLANK